

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-181656

(43)Date of publication of application : 05.07.1994

(51)Int.Cl.

A01K 61/00

A23K 1/16

A61K 35/74

(21)Application number : 04-336404

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 16.12.1992

(72)Inventor : YUKIMURA ICHIRO
TORIDE YASUHIKO

(54) PREVENTIVE/MEDICINE FOR VIRAL DISEASE IN FISH AND CRUSTACEAN AND FEED CONTAINING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a safe preventive/medicine effective for viral diseases in fish and crustacean, and to provide a feed formulated therewith.

CONSTITUTION: The objective preventive/medicine comprising at least one kind selected from (A) sterilized products from the microbes of bacteria belonging to Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Escherichia, Lactobacillus, Streptococcus, Streptomyces or Bifidobacterium, (B) crushed products obtained by mechanical crushing or enzymolysis of the microbes and (C) cell wall-contg. products obtained by fractionating the crushed products B. The other objective feed can be obtained by formulating a feed with the above preventive/medicine.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-181656

(43) 公開日 平成6年(1994)7月5日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 K 61/00	B	8602-2B		
A 2 3 K 1/16	3 0 4 B	9123-2B		
A 6 1 K 35/74	A F E C	7431-4C		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平4-336404	(71) 出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22) 出願日	平成4年(1992)12月16日	(72) 発明者	幸村 一郎 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
		(72) 発明者	取出 恭彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
		(74) 代理人	弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 魚類・甲殻類のウイルス病予防治療剤及び飼料

(57) 【要約】

【目的】 魚類・甲殻類のウイルス病に有効で安全な予防治療剤及びこれを配合した飼料を提供する。

【構成】 バチラス属、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、アセリシア属、ラクトバチラス属、ストレプトコッカス属、ストレプトミセス属又はビフィドバクテリウム属に属する細菌の菌体の殺菌処理物、該細菌の菌体を機械的破碎処理もしくは酵素分解処理を行うことによって得られる細胞破碎物及びこの細胞破碎物を分画して得られる細胞壁成分含有物のうち少なくとも一種を飼料に配合する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 パチラス属、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エセリシア属、ラクトパチラス属、ストレプトコッカス属、ストレプトマイセス属又はビフィドバクテリウム属に属する細菌の菌体の殺菌処理物、該細菌の菌体を機械的破碎処理もしくは酵素分解処理を行うことによって得られる細胞破碎物及びこの細胞破碎物を分画して得られる細胞壁成分含有物のうち少なくとも一種を含有することを特徴とする魚類・甲殻類のウイルス病予防治療剤。

【請求項2】 請求項1記載のウイルス病予防治療剤を含む魚類・甲殻類用飼料。

【請求項3】 前記ウイルス病予防治療剤を、細菌細胞壁成分乾燥物として全試料中0.01～5%含むことを特徴とする請求項2記載の魚類・甲殻類用飼料。

【請求項4】 前記ウイルス病予防治療剤を、細菌細胞壁成分乾燥物として全試料中0.05～1%含むことを特徴とする請求項2記載の魚類・甲殻類用飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、魚類・甲殻類のウイルス病予防治療剤及びそれを含む養魚用飼料に関する。

【0002】

【従来の技術】養魚技術は近年急速な発展を遂げ、養殖生産量は年々増加している。しかし、天然の魚類・甲殻類と違い、高い密度で飼育されるために、病気にかかるものも多い。特に病原性細菌やウイルスによる病気による被害が多い。

【0003】例えば、近年、特にタイ国において、エビ黄頭病(yellow-head disease)が増加している。黄頭病は、ブラックタイガー(Penaeus monodon)に対し極めて高い死亡率を示す病気であり、本発明者らによりウイルス性であることが判明している。黄頭病に感染したエビは腹部が淡色化し、頭胸部が黄色に着色する。感染した集団は、発病から3～5日以内に全滅することもまれではなく、養殖場では大きな問題となっている(Mali et al. 魚病研究—fish pathology—日本魚病学会に投稿準備中)。

【0004】従来、魚類・甲殻類等の伝染性疾患に対しては、抗生物質が使用されてきたが、耐性菌の発生や、魚類等への抗生物質の残留という問題が起こり、使用が制限されている。これらの病気のうち細菌病に対しては、抗生物質に代わるものとして、細菌の細胞壁成分が著効を示すことが見いだされ、細菌病に対する安全性の高い予防治療薬等として開発されている(特開平4-193832号)が、ウイルス病に対しては、抗生物質に代わる有効な薬剤は知られていない。

【0005】ところで、細菌の細胞壁成分は、免疫賦活剤(アジュバント)として古くから知られており、ミコバクテリウム・ボビスの細胞壁から調整したものについ

2

ては、免疫増強活性ならびにガン免疫療法剤としての有効性が検討されている(癌、第65巻493～505ページ、1974年)。また、家畜疾病を対象としたものとしてビフィドバクテリウム・サーモフィラムの細胞壁から調整したものをを用いた家畜下痢予防治療薬としての利用が報告されている(Jpn. J. Vet. Sci. 49巻、235～243ページ、1987年、特開昭62-265231号公報)。

【0006】しかしながら、魚類や脊椎動物でない甲殻類の免疫機構は、哺乳類とは異なっている上に、細菌とウイルスでは感染、増殖の機構が全く異なっているもので、細菌に対する予防治療薬がウイルスに対して効果を示すとは一般には考えられていない。

【0007】これに対し、基礎飼料に胆汁末及びペプチドグリカン含有細菌菌体末を混合した家畜、家禽、及び魚類用の抗仮性狂犬病ならびに抗病性飼料が開示されている(特開平4-287647号)。しかし、この抗病性飼料は、動物における仮性狂犬病ウイルスに対する抗病性は示されているものの、魚類については抗病性の指標としてリゾチーム活性の上昇が示されているのみであり、ウイルス病の予防治療効果は明らかにされていない。また、甲殻類については言及されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記現状に鑑み、なされたものであり、抗生物質に代わり得る安全で優れた効果を有する魚類・甲殻類のウイルス病予防治療剤を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、細菌の細胞壁成分が、魚類・甲殻類のウイルス病に有効であることを見出し、本発明に至った。

【0010】すなわち本発明は、パチラス属、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エセリシア属、ラクトパチラス属、ストレプトコッカス属、ストレプトマイセス属又はビフィドバクテリウム属に属する細菌の菌体の殺菌処理物、該細菌の菌体を機械的破碎処理もしくは酵素分解処理を行うことによって得られる細胞破碎物及びこの細胞破碎物を分画して得られる細胞壁成分含有物のうち少なくとも一種を含有することを特徴とする魚類・甲殻類のウイルス病予防治療剤及びこれらを含む飼料である。

【0011】尚、本発明においては、魚類・甲殻類には、ブリ、タイ、ウナギ、コイ、ニジマス、アユ、ギンザケ、マアジ、ティラピア、ヒラメ、フナ、クルマエビ、ブラックタイガー等が含まれる。ウイルス病としては、エビ黄頭病等が挙げられる。また、本発明でいう予防治療剤とは、ウイルス病の感染及び発病の予防あるいはすでに発病したものを治療するものを含む。

【0012】以下本発明を詳細に説明する。本発明に

は、細菌の菌体の殺菌処理物、菌体を機械的破碎処理もしくは酵素分解処理を行うことによって得られる細胞破碎物あるいはこの細胞破碎物を分画して得られる細胞壁成分含有物（以下、「細菌細胞壁成分」という。）が用いられ、これらは、単独でも任意の混合物としても使用できる。

【0013】上記細菌細胞壁成分の調製に用いる細菌としては、バチラス・サチラス(*Bacillus subtilis*)等のバチラス属細菌、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタム(*Brevibacterium lactofermentum*)等のプレバクテリウム属細菌、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)等のコリネバクテリウム属細菌、エセリシア・コライ(*Escherichia coli*)等のエセリシア属細菌、ラクトバチラス・アシドフィラス(*Lactobacillus acidophilus*)等のラクトバチラス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*)等のストレプトコッカス属細菌、ストレプトマイセス・タナシエンシス(*Streptomyces tanashiensis*)等のストレプトマイセス属細菌、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム(*Bifidobacterium thermophilum*)等のビフィドバクテリウム細菌などが例として挙げられる。

【0014】これらの細菌の培養には、通常これらの細菌が資化しうる栄養源であれば何でも使用し得る。たとえばグルコース、シュクロース等の炭水化物、エタノール、グリセロール等のアルコール、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、大豆油等またはこれらの混合物の炭素源、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、硫酸、アンモニア等の含窒素無機有機栄養源、リン酸塩、マグネシウム、鉄、マンガン、カリ等の無機栄養源、およびビオチン、チアミン等のビタミン類を適宜配合した通常の培地が用いられる。

【0015】培養の方法としては、例えば、栄養培地のpHを4.0~9.5の範囲で20℃~40℃で12時間~5日間培養すればよい。本発明に用いる細菌細胞壁成分は、培養によって得られた菌体を遠心分離や濾過等により培養物から分離し、かつ、加熱処理等で殺菌したものをそのまま用いることができるが、菌体の破碎処理を行ったものが好ましい。殺菌処理としては、加熱処理、オートクレーブ処理等が挙げられる。また、破碎処理の方法には、例えば機械的方法、酵素を利用した方法が挙げられ、用いる菌体は生菌体、殺菌処理物のいずれであってもよい。

【0016】機械的方法としては、例えば、フレンチプレスなどを用いて約800~2000 kg/cm²の圧力で菌体の破碎を行う方法、細菌懸濁液にガラスビーズを加えて急速攪拌する方法、あるいは超音波破碎機を用いて超音波印加により細胞の破碎を行う方法が挙げられる。酵素を利用して細菌細胞を破碎する場合には、培養菌体あるいは培養菌体の機械的破碎処理物を生理食塩水

等に懸濁し、これに細胞壁溶解酵素を添加し菌体の細胞壁を分解する。この際用いる酵素は、細胞壁を分解する能力のあるものであれば、いかなるものでもよく、リゾチーム、プロテアーゼなどが代表例である。酵素処理条件は公知の方法に従えばよい。

【0017】機械的方法、酵素法のいずれにおいても、細胞の破碎率は20%程度以上がよく、60%程度以上が好ましい、破碎率は懸濁液の波長660nmにおける濁度減少率等で測定できる。また、破碎率を高めるためには機械的方法と酵素法を併用することが好ましい。

【0018】菌体の破碎処理物を分画して、細胞壁成分含有物を分離し用いることもできる。分画方法は、遠心分離や濾過により単に不溶物を除去するだけでもよく、また、蛋白質等を分子量分画する公知の方法、例えば限外濾過、ゲル濾過等の方法を利用できる。

【0019】本発明の予防治療剤は、上記細胞壁成分を含有するものであり、細胞壁成分そのものでもよく、あるいは通常用いられる基剤に細胞壁成分を配合してもよい。使用方法としては、予防治療剤を直接又は飼料に添加して経口で与えることができる。

【0020】また、飼料としては、通常養殖用に用いられている飼料原料を対象に応じて適宜選択、配合し、これに上記ウイルス病予防治療剤を配合すればよい。飼料原料としては、一般的には魚粉、骨粉、スキムミルク、綿実粕、小麦粉、小麦胚芽、米ぬか、ビール酵母、ビタミン等が用いられる。飼料に上記ウイルス病予防治療剤を配合する際の配合比率は、細菌細胞壁成分乾燥物が、全試料中好ましくは0.01~5%、さらに好ましくは0.05~1%となるようにすればよい。

【0021】本発明の予防治療剤又は飼料の投与時期は問わないが、仔稚魚期より与えておけば予防的効果がある。

【0022】

【実施例】以下に、本発明の実施例を説明する。

【0023】

【実施例1】細菌細胞壁成分の調製例を説明する

<1>菌体の取得

グルコース 1.0 g、酵母エキス 1.0 g、ペプトン 1.0 g、(NH₄)₂SO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.3 g、KH₂PO₄ 0.1 g、及びMgSO₄·7H₂O 0.05 gを100mlの水に溶解させた培地(pH7)を500ml容フラスコに50ml入れ、115℃で15分間殺菌した。

【0024】上記培地に、ブイオン寒天培地で30℃で1日間培養したバチラス・サチラスATCC 13952、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC 13060、エセリシア・コライATCC 8739、ラクトバチラス・アシドフィラスATCC 4356、ストレプトコッカス・サーモフィラスATCC 19987、ストレプトマイセス・タナシエンシスATCC 15238

をそれぞれ1白金耳接種し、30℃で24時間振盪培養した。培養終了後各培養液とも遠心分離して菌体を集めた。各菌体をいずれも培養液と同量の生理食塩水に懸濁して100℃で10分間加熱処理を行い、再び遠心分離*

*により菌体を集めた。得られた菌体湿重量を表1に示す。

【0025】

【表1】

菌 株	菌体湿重量 (g/100ml)
ハチラス・チラス ATCC 13952	4. 0
ブレバ・バクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869	5. 7
ブレバ・バクテリウム・ク・ル・シム ATCC 13060	5. 1
エセリヤ・コライ ATCC 8739	4. 5
ラクトバチラス・アシトフィラス ATCC 4356	1. 0
ストレプトコッカス・サーモフィラス ATCC 19987	0. 4
ストレプトマイセス・タジエンシス ATCC 15238	2. 0

【0026】＜2＞機械的破碎処理物の調製

20

上記で得られた各菌体（湿菌体）を、いずれも25mMのリン酸緩衝液（pH 7.0）に10重量%になるように懸濁した。この菌体懸濁液をステンレスボトル（5ml容）に入れ、超音波破碎器（トミー精工株式会社製、UR-200P型）を用いて発振周波数20kHz、200Wの出力で15分間超音波処理を行った。この後、さらに遠心分離を行い、細菌細胞壁成分を分画し回収した。

【0027】＜3＞酵素分解処理物

＜2＞で得られた機械的破碎処理物を、固形物として10重量%含む25mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に卵白リゾチーム（シグマ社製）0.01重量%とアクチナーゼ（科研製薬製 7000単位）0.02重量%を添加し、37℃で12時間酵素処理を行った。その後、100℃で2分間加熱処理して酵素を失活させ、常法により凍結乾燥を行った。

【0028】

【実施例2】

＜1＞エビ用ウイルス病予防治療剤を含む飼料の調製
ブラックタイガー用の配合飼料を、表2の組成で配合し、これに実施例1＜3＞で得られたブレバ・バクテリウム・ラクトファーマンタムの菌体破碎酵素分解処理物を0.05、0.1、1.0重量%添加した。得られた配合物を常法によりペレット状に成型してブラックタイガー用飼料を得た。

【0029】

【表2】

原 料	配合割合（重量部）
米ぬか	6
米麹粉	3. 5
小麦粉	20
小麦グルテン	5
エビミール	10
イカミール	5
大豆粕	10
魚粉	30
イカ肝油	2
レシチン	1
ビタミン混合物	1
ミネラル混合物	5
ゼオライト	1. 5

【0030】＜2＞エビ黄頭病に対する効果

黄頭病にかかったブラックタイガーの死骸に対し2倍量の緩衝液を加えて抽出した抽出液を、ポアサイズ0.2ミクロンのフィルターで濾過したものを健常なブラックタイガーの腹部筋中に注入すると、黄頭病特有の症状で斃死する。このことや、電子顕微鏡による観察から、黄頭病がバキュロウイルス属のウイルスにより引き起こされることがわかった。

【0031】上記で得られたブラックタイガー用飼料をブラックタイガーに与え、黄頭病ウイルスに対する予防効果を調べた。健常なブラックタイガー（平均体重2g）に、1日5回、上記4種類の飼料を与えた。54日後に、各々の飼料を与えた10匹づつのブラックタイガーに、上記と同様にした得られたウイルス抽出液を10⁻⁷倍希釈したもの、あるいはコントロールとしてウイルスを含まない緩衝液を注入し、その後の生存率を調べ

た。結果を表3に示す。

【0032】

【表3】

感染後の 日数	与えた細胞壁成分の量における生存率(%)				
	0	0.01	0.1	1.0	コントロール
1	90	100	90	80	90
2	80	90	90	80	90
3	70	80	90	70	90
4	70	80	90	70	90
5	70	80	90	70	90
6	60	60	90	70	90
7	60	60	90	70	90
8	60	60	90	70	80
9	60	60	90	70	80
10	50	60	90	60	80
11	10	60	60	40	70

【0033】健全なエビに黄頭病ウイルスを感染させると、11日後には生存率が10%まで低下するが、本発明の飼料を与えることにより、生存率を40~60%に高めることができた。尚、ウイルスを感染させなくても

自然生存率は70%程度に低下する。

【0034】次に、 10^{-6} 倍希釈したウイルスを用いて上記と同様に生存率を調べた。結果を表4に示す。

【0035】

【表4】

感染後の 日数	与えた細胞壁成分の量における生存率(%)				
	0	0.01	0.1	1.0	コントロール
5	60	90	72	72	100
10	0	35	27	50	84

10

【0036】感染させるウイルスの濃度を10倍高めると、10日後にはすべて斃死したが、本発明の飼料を与えると生存率は30~50%であった。これらの結果から、本発明の予防治療薬及び飼料は、ウイルス病に対して有効であることがわかる。

【0037】

【発明の効果】本発明により、魚類・甲殻類のウイルス病に有効で安全な予防治療薬及びこれを配合した飼料を提供することができる。

【手続補正書】

【提出日】平成5年12月13日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項3

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項3】前記ウイルス病予防治療剤を、細胞破砕物乾燥物として全試料中0.01~5%含むことを特徴とする請求項2記載の魚類・甲殻類用飼料。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項4

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項4】前記ウイルス病予防治療剤を、細胞破砕物乾燥物として全試料中0.05~1%含むことを特徴とする請求項2記載の魚類・甲殻類用飼料。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】以下本発明を詳細に説明する。本発明には、細菌の菌体の殺菌処理物、菌体を機械的破砕処理もしくは酵素分解処理を行うことによって得られる細胞破砕物あるいはこの細胞破砕物を分画して得られる細胞壁

成分含有物、又はこれらの乾燥物（本明細書において以上のものを「細菌細胞壁成分」という。）が用いられる。これらの細菌細胞壁成分は、単独でも任意の混合物としても使用できる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】本発明の予防治療剤は、上記細菌細胞壁成分を含有するものであり、細菌細胞壁成分そのものでもよく、あるいは通常用いられる基剤に細菌細胞壁成分を配合してもよい。使用方法としては、予防治療剤を直接又は飼料に添加して経口で与えることができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】また、飼料としては、通常養殖用に用いられている飼料原料を対象に応じて適宜選択、配合し、これに上記ウイルス病予防治療剤を配合すればよい。飼料原料としては、一般的には魚粉、骨粉、スキムミルク、綿実粕、小麦粉、小麦胚芽、米ぬか、ビール酵母、ビタミン等が用いられる。飼料に上記ウイルス病予防治療剤を配合する際の配合比率は、細胞破砕物乾燥物を使用す

る場合、全試料中好ましくは0.01～5%、さらに好ましくは0.05～1%となるようにすればよい。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】

【実施例2】

<1>エビ用ウイルス病予防治療剤を含む飼料の調製
ブラックタイガー用の配合飼料を、表2の組成で配合し、これに実施例1<3>で得られたプレバクテリウム・ラクトファーマンタムの菌体破碎酵素分解処理物を0、0.01、0.1、1.0重量%添加した。得られた配合物を常法によりペレット状に成型してブラックタイガー用飼料を得た。